

# 一株热带土壤解磷细菌的筛选鉴定及拮抗初探

王义<sup>1,2</sup>, 余贤美<sup>2,3,4</sup>, 贺春萍<sup>2,3,4</sup>, 郑服丛<sup>1,2</sup>\*

(1. 海南大学环境与植物保护学院, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737; 3. 农业部热带农林有害生物入侵检测与控制重点开放实验室, 海南儋州 571737; 4. 海南省热带农业有害生物监测监控重点实验室, 海南儋州 571737)

**摘要** [目的] 研究热带土壤解磷微生物种群结构, 筛选鉴定高效解磷菌株, 为热带土壤解磷细菌的筛选和菌肥制备奠定基础。[方法] 以有机磷液体培养基进行生物富集, 无机磷固体培养基平板法从海南、广东、云南等地热带土壤中筛选出解磷效果较好的一株解磷细菌 PSB13。[结果] 通过细菌 16 S rRNA 通用引物 PCR 扩增该菌株的 16 S rDNA 序列, 测得序列长度为 1 088 bp, 经 Blastn 搜索进行序列比对, 结果表明, 该菌株属于 *Burkholderia* sp。进一步的室内平板对峙培养试验表明, PSB13 对 *Fusarium oxysporum piperis* 等 11 个供试病原菌中的 9 个具有不同程度的拮抗作用。[结论] PSB13 是一株高效的具有开发前景的热带土壤解磷菌株。

**关键词** 热带土壤; 解磷细菌; 16 S rDNA; 分子鉴定; 拮抗

**中图分类号** S 182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08347-03

**Screening and Identification of One Strain of Phosphate-solubilizing Bacteria from the Tropical Soil and the Study on Its Antagonism**  
WANG Yi et al (Environment and Plant Protection College, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract** [Objective] The basis of the isolation of the bacteria solving phosphorus from tropical soil and the preparation of bio-bacteria fertilizer was laid through the research on the structure of microbiology and selection and identification of the bacteria strain with the ability in the phosphorus-solving, [Method] The organic phosphobacteria liquid medium was used for biological enriching culture. A bacteria strain-PSB13 with the high-efficiency ability in the phosphorus-solving was screened from the sample of tropical soils from Hainan, Guangdong and Yunnan province with the method of inorganic plate solid culture. [Result] The 16 S rDNA sequence of the strain was amplified with PCR technique and its length was 1 088 bp. Compared with Blastn, the result showed that the strain belonged to *Burkholderia* sp. The results of in-door antagonism experiment indicated that the PSB13 had antagonism reaction to 9 of the 11 pathogens 11 strains such as *Fusarium oxysporum piperis*. [Conclusion] The PSB13 was one strain with he high-efficiency ability in the phosphorus-solving, which could have the good viewpoint of utilization and development.

**Key words** Tropical Soil; Bacteria solving phosphate; 16 S rDNA; Molecular identification; Antagonism

磷是植物生长发育的重要物质基础, 是植物体内核酸及多种酶、辅酶、ATP 等的重要组成成分, 这些物质对于细胞来说是至关重要的。作物吸收磷量与其生物量和产量呈显著的正相关。但土壤中的磷绝大部分呈有机或无机磷化物状态, 植物不能直接吸收, 解磷菌能将植物难以吸收利用的磷转化为植物可吸收利用的磷, 因此, 利用微生物的解磷作用可弥补土壤磷素营养的不足。目前, 这已成为国内外非常关注的研究课题<sup>[1]</sup>。大量的研究结果证明, 土壤中存在大量的微生物, 能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态, 具有这种能力的微生物称为解磷菌或溶磷菌 (Phosphate-solubilizing microorganisms, PSM)<sup>[2]</sup>。尹瑞玲发现, 我国旱地土壤解磷菌平均为  $10^7$  cfu/g, 占土壤微生物总数的 27% ~ 82%, 其中细菌所占比例最大<sup>[3]</sup>。

笔者以自行创建的解磷细菌筛选体系, 即以有机磷液体培养基进行富集, 然后以无机磷固体培养基通过平板稀释法进行筛选, 对筛选所得解磷细菌中解磷能力较强的 PSB13 进行了分子鉴定和拮抗作用的初步研究, 以期初步探明热带土壤的解磷细菌结构, 为热带土壤解磷细菌的筛选和菌肥制备等奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 供试菌株** 该研究中所用待测菌株为前期工作中分离获得的解磷细菌 PSB13 (Phosphate solubilizing bacteria, PSB), 供试真菌由中国热带农业科学院环境与植物保护研究

**基金项目** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目 (2008hzz1J014); 国家科技支撑计划项目 (2007BAD48B04); 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-033-2-3)

**作者简介** 王义 (1982-), 男, 四川汶川人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。\* 通讯作者, E-mail: zhengfucong@126.com。

**收稿日期** 2009-03-20

所提供, 详见表 1。

表 1 用于拮抗试验的菌株  
Table 1 Strains used for antagonism test

编号 No.	菌株学名 Scientific name	编号 No.	菌株学名 Scientific name
92FJTPG1	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp.	Foc-4R	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense
F42	<i>Fusarium solani</i>	港 ZR27	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc.
Fx31	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. Vanille	FS2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.
LF9915	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp.	LF30	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp.
F27	<i>Fusarium solani</i>	玉 62C	<i>Pythium spinosum</i>
F14	<i>Fusarium oxysporum piperis</i>		

**1.2 土样采集** 该研究土样采自海南、广东、云南等地热带气候地的土壤, 以海南为主。土样类型为红壤土、黏壤土、黄沙壤、砖红壤, 以砖红壤为主。采样深度 5 ~ 20 cm。将野外采集回来的土样自然风干, 用研钵研细过筛 (200 目) 后贮存于塑料袋并编号, 共 33 个土样, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

**1.3 土壤解磷细菌的分离和纯化** 土样中细菌分离采用无机磷培养基平板检测和平板稀释法。称取各土样 1 g 粉末, 加入 100 ml 的 LB 液体培养基中, 于 28 °C、190 r/min 条件下振荡培养 48 h。

按 10 倍稀释法进行稀释,  $10^{-3}$  ~  $10^{-7}$  5 个稀释度各取 200 μl 上清液, 每个稀释度做 3 次重复。在无机磷培养基固体平板上涂布均匀, 28 °C 条件下恒温培养 3 ~ 5 d, 观察平板中菌落生长情况及透明解磷圈的产生情况<sup>[4]</sup>。将各个单菌落在无机磷培养基固体平板上进行划线分离及纯化, 根据透明解磷圈的大小筛选出产解磷能力较强的菌株。

挑取在初筛平板上产圈较大的单菌落 PSB13, 进行点接和划线培养, 以透明解磷圈是否产生进行其解磷能力的定性检测。并根据透明解磷圈的大小对细菌的解磷能力进行初

步判断。

**1.4 解磷细菌解磷能力的定性检测** 挑取在初筛平板上产圈较大的单菌落 PSB13 进行点接和划线培养,采用解磷圈法,将菌株单菌落点接于固体培养基平板上,并以 1 个在初筛平板中不产生解磷圈的菌株为对照。3 次重复,28 °C 恒温培养 7 d,根据解磷圈直径与菌落直径的比值(HD/CD)大小初步确定该菌株解磷能力的强弱。

#### 1.5 菌株的分子鉴定

**1.5.1 细菌菌液的制备。**从划线培养的平板上挑单菌落接种到 100 ml LB 液体培养基中,37 °C,200~300 r/min 振荡培养过夜。

**1.5.2 引物设计。**所用引物为细菌 16 S rDNA 通用引物<sup>[5-6]</sup>:P1:5'-TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA-3';P2:5'-AGTAAGGAGGTGATCCAACCGCA-3'。

引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,配成 100 µg/ml 的母液备用。预期获得 1 000 bp 左右的片段。

**1.5.3 PCR 反应体系及反应条件。**反应体系:25 µl 体系中含有 10 × PCR buffer 2.5 µl,dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2.0 µl,P1 (10 mg/kg)1.0 µl,P2 (10 mg/kg)1.0 µl,Template 1.0 µl,Taq 酶(5 U/µl) 0.2 µl,ddH<sub>2</sub>O 17.3 µl。

反应条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,64 °C 1 min,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 10 min。

**1.5.4 PCR 产物的回收。**PCR 产物的回收,按照 TaKaRa PCR Fragment recovery kit 说明书进行。

**1.5.5 Vector 与 PCR 产物的连接。**取 1.0 µl PCR 产物与克隆载体 PMD 18-T vector 连接,5.0 µl 连接反应体系中含有 PMD 18-T vector 0.5 µl,ligation solution 2.5 µl,PCR 产物 1.0 µl,ddH<sub>2</sub>O 1.0 µl。充分混匀后离心数秒,将管壁液滴收到管底,16 °C 水浴 16~18 h。

**1.5.6 连接产物的转化及测序。**连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,涂平板,待菌液吸干后倒置平板于 37 °C 下培养 12~16 h;随机挑取白色单菌落到含有 Amp 50 mg/L 的 LB 液体培养基中,37 °C,200~300 r/min 振荡培养过夜,然后以 1.0 µl 菌液为模板进行 PCR 扩增反应,同时以无菌水为模板设为对照。反应体系及反应条件同“1.5.3”。

将阳性克隆穿刺培养,寄往上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序结果通过 GenBank 中的 Blastn 搜索数据库进行序列的同源性比较分析,并用 DNASTar 软件构建系统进化树。

**1.6 解磷细菌对常见病原菌的拮抗试验** 用 5 点接菌法将供试菌株接在 PDA 平板中央,解磷细菌接于四周,进行对峙试验。每个处理做 3 个重复,于 28 °C 条件下,倒置培养 3~10 d 观察结果。

## 2 结果与分析

**2.1 解磷细菌的分离筛选及定性检测** 以有机磷液体培养基进行富集,无机磷固体培养基平板法初筛,并对所筛得菌株点接和划线以定性,共筛得具有解磷效果的细菌 75 个,其中 PSB13 效果最好且较稳定(图 1)。

**2.2 固体培养条件下解磷能力的测定** 将 PSB13 及对照点接到无机磷固体培养基平板上,3 次重复,培养 7 d 后,测

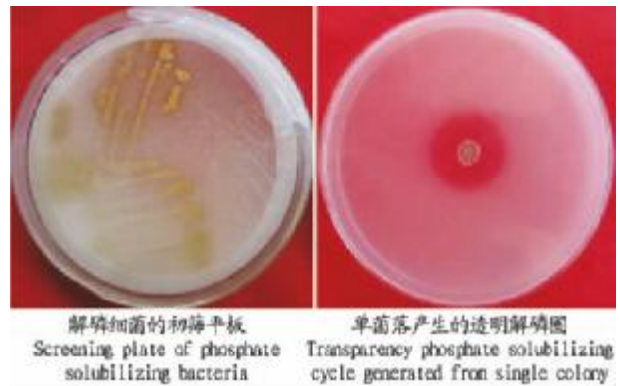


图 1 解磷细菌的分离筛选

**Fig. 1 Isolation and screening of phosphate solubilizing bacteria** 其解磷圈直径与菌落直径,根据 HD/CD(HD 为解磷圈直径,CD 为菌落直径)值确定该菌株的解磷能力。试验得出,对照的 HD/CD 值为 1.00(1.02/1.02),PSB13 的 HD/CD 值为 3.60(3.46/0.96)(图 2)。

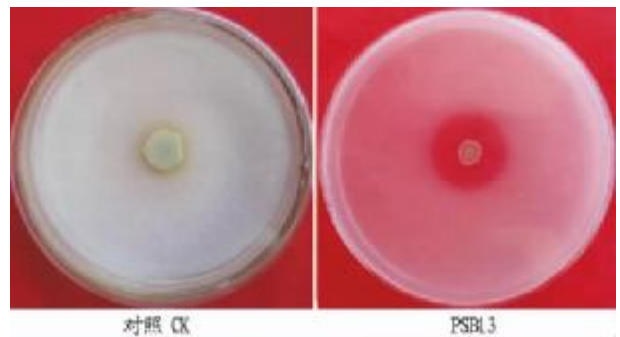
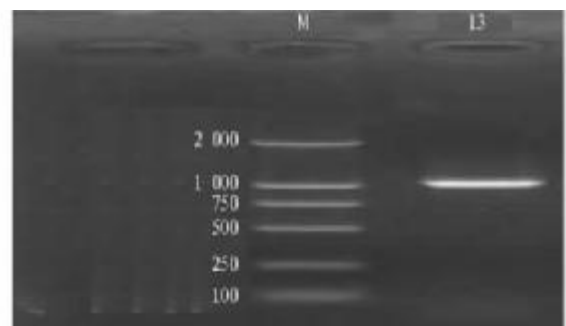


图 2 解磷圈观察

Fig. 2 Observation of phosphate solubilizing cycle

**2.3 PCR 产物电泳检测及回收转化** 菌液经 PCR 后产物由 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得了约 1 000 bp 大小的片段(图 3)。PCR 产物经 TaKaRa PCR Fragment recovery kit 回收,连接到克隆载体 pMD 18-T 后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。



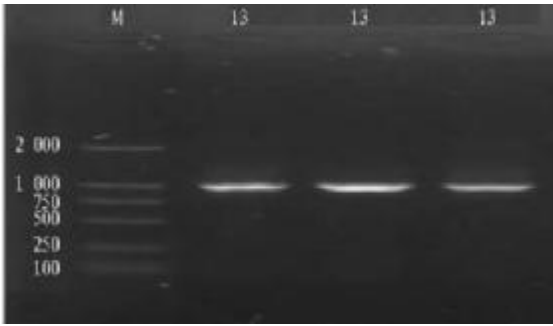
注:M 为 DNA Marker DL2000;13 为菌样的 PCR 产物。

Note: M. DNA Marker DL2000;13. PCR products of bacteria samples.

图 3 PCR 产物电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of PCR products

**2.4 转化子的菌落 PCR 检测** 挑取 3 个白色单菌落,接种于含 Amp 50 mg/L 的 LB 液体培养基振荡培养过夜,以菌液为模板进行 PCR 扩增,以水为模板为阴性对照,以不加 Amp 50 mg/L 的 LB 为阳性对照。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。所挑选的转化子扩增得到 1 000 bp 左右的条带(图 4),表明所挑取的转化子为阳性克隆。



注: M 为 DNA Marker DL2000; 13 为菌样的转化子 PCR 产物。  
 Note: M. DNA Marker DL2000; 13. Transform PCR products of bacteria samples.

图 4 转化子 PCR 检测电泳图谱

Fig. 4 Detected Electrophoretogram for transformant PCR

**2.5 序列分析与系统进化树的构建** 将菌株挑选 2 个阳性克隆, 寄往上海英骏生物技术有限公司测序, 测序结果为: 所获得的基因片段为 1 088 bp。通过 Blastn 搜索, 该片段与 *Burkholderia* sp. 具有 99% 的同源性, 并构建系统进化树 (图 5), 结果表明, PSB13 与 *Burkholderia* sp. (accession No. AB212239) 亲缘关系最近, 因此, 可将 PSB13 鉴定为 *Burkholderia* sp.。同时将其 16 S rDNA 序列提交 GenBank (accession No, FJ644952)。

**2.6 拮抗作用** 通过对 11 个供试病原菌菌株进行室内平板对峙试验的结果表明, 菌株 PSB13 在培养基平板中能够较好地抑制其中 9 个真菌菌丝的生长, 真菌菌落形态有变异, 趋向于向十字形菌落发展, PSB13 对 92FJTTPG1、F14、F42、

Foc-4R、Fs2、LF30、LF9915、玉 62C、湛 ZR27 9 个菌株有不同程度地拮抗作用 (图 6)。各个真菌菌落与 PSB13 菌落间不融合, 有较明显的抑菌带, 抑菌带宽为 2.0 ~ 13.5 mm。

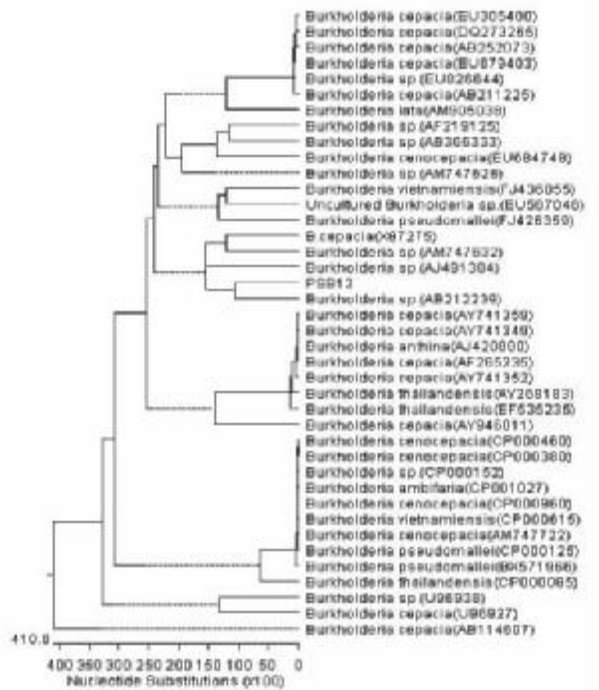
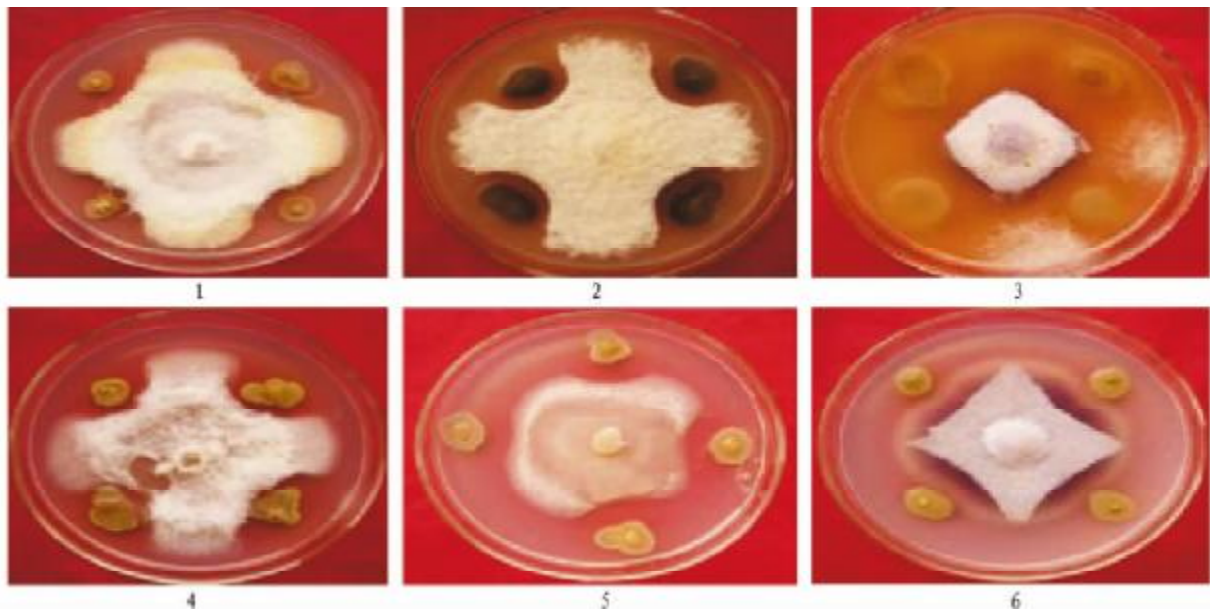


图 5 PSB13 根据 16 S rDNA 序列构建的系统进化树  
 Fig. 5 The constructed phylogenetic tree of PSB13 based on 16S rDNA sequence



注: 1: PSB13 (F42); 2: PSB13 (92FJTTPG1); 3: PSB13 (F14); 4: PSB13 (Fs2); 5: PSB13 (玉 62C); 6: PSB13 (F42)。  
 Note: 1. PSB13 (F42); 2. PSB13 (92FJTTPG1); 3. PSB13 (F14); 4. PSB13 (Fs2); 5. PSB13 (玉 62C); 6. PSB13 (F42)。

图 6 PSB13 对常见病原菌的拮抗作用

Fig. 6 The antagonism effect of PSB13 on common pathogen

**3 讨论**

随着农业生产的不断发展, 农作物单位面积产量不断提高, 对肥料的需求量也越来越大。目前, 农业生产对磷肥的需求日益增大, 我国土壤缺磷的面积较大, 据估计约占总耕地面积的 2/3。除了人工施用化学磷肥以外, 施用能够分解土壤中难溶态磷的解磷细菌肥料, 使其在作物根际形成一个

磷素供应较充分的微区, 从而改善作物磷元素的供应, 也是一个重要途径。

解磷微生物肥料具有成本低、工艺简单、肥效高、污染少, 增强作物抗病能力及能促进作物对其他元素的吸收等优点, 前苏联研究者蒙基娜 (P. A. менкина) 1935 年从土壤中 (下转第 8405 页)

由表 2 可知,整个生育期,  $F_v/F_m$ 、 $\Phi PSII$ 、 $qP$  和  $qNP$  均呈先增加后减少的趋势,在播后 75 d 达最大值。 $D_3$  密度的  $F_v/F_m$ 、 $\Phi PSII$ 、 $qP$  整体上均比其他 3 个密度的高,而  $D_3$  密度的  $qNP$  与其他 3 个密度相比相对较低。

表 3 不同密度对天农糯 5 号玉米产量因素及经济效益的影响

Table 3 Effects of different planting densities on yield factors and economic benefits of Tiannongnuo 5

处理 Treatment	穗行数 Ear rows	行粒数 Row grains	千粒重 //g 1 000-grain weight	成穗率//% Spike rate	合格果穗率//% Qualified ear rate	一级果穗率//% First ear rate	鲜穗产量效益//元/hm <sup>2</sup> Benefits of fresh ear yield
D <sub>1</sub>	13.56	35.42	316.21	100	98.7	94.3	24 180
D <sub>2</sub>	14.65	35.63	311.53	98.0	94.2	87.2	27 390
D <sub>3</sub>	15.76	37.52	310.50	95.0	85.5	80.3	29 775
D <sub>4</sub>	14.45	35.36	301.56	74.5	73.2	64.8	23 580

### 3 结论与讨论

玉米叶片是进行光合作用的主要器官,叶片光合作用是能量吸收、传递、转化的物质基础,其合理的叶片结构是获得高产的前提条件。从玉米的群体光合效应来看,叶片冠层情况对吸收光能的程度不一样,从而影响整个植株的光合作用及群体光合效应。光合速率( $P_n$ )、表观量子效率( $\epsilon$ )、暗呼吸速率( $R_d$ )反映植物合成物质的能力, $F_v/F_m$ 、 $\Phi PSII$ 、 $qP$  和  $qNP$  反映了植物光化学反应速率的高低。

该试验结果表明,天农糯 5 号的经济产量在  $D_3$  密度 >  $D_2$  密度 >  $D_1$  密度 >  $D_4$  密度,这与  $P_n$ 、 $F_v/F_m$ 、 $\Phi PSII$ 、 $qP$  表现出了一致的变化规律。说明  $D_3$  密度(6.00 万株/hm<sup>2</sup>)更接近天农糯 5 号玉米群体光合最大时的合理密度,从而更有效、更合理地吸收和利用了最大光能,积累了更多的同化物,为获得高产奠定了基础。此研究符合前人研究群体光合速率和作物产量成一定的正比关系。

### 参考文献

[1] 佟屏亚. 确立玉米在饲料中料的主导地位[J]. 中国农业资源与区划,

(上接第 8349 页)

分离到一种解磷巨大芽孢杆菌(*B. megatherium phosphaticum*),分解核酸和卵磷脂的能力很强,接种于土壤中能提高土壤的有效磷含量。据报道,接种后土壤中  $P_2O_5$  提高 15% 以上<sup>[4]</sup>。陈廷伟<sup>[7]</sup>、陈华癸<sup>[8]</sup>、尹瑞龄<sup>[3]</sup>、唐勇等<sup>[9]</sup>都曾分离到解磷效果较好的菌株且进行了大田试验,增肥增产效果也都比较明显,但由于种类繁多,解磷机制不尽相同且比较复杂,研究尚未完全透彻等原因,解磷微生物的研究发展非常缓慢,应用也不普遍。鉴于此,更应该加强解磷微生物优质菌株的筛选和基础研究。笔者以自行创建的解磷细菌筛选体系从此前未涉及的热带土壤中筛选出一株效果较好的解磷细菌 PSB13,经 16 S rDNA 序列分析,对其进行了分子鉴定,结果表明 PSB13 为 *Burkholderia* sp.。拮抗试验显示,该菌株对靶标菌也都有较好的拮抗作用。进一步做好热带土壤解磷细菌的复壮及生防效果、热带土壤解磷微生物的结构研

### 2.3 不同栽培密度对糯玉米产量及经济效益调查分析结果

由表 3 可知,天农糯 5 号糯玉米在相同的农用物资投入和相同的农事操作管理水平时, $D_3$  密度时对农业增效最大。

1995,8(3):24-27.

- [2] 路海东,薛吉全,马国胜. 夏玉米不同群体的受光态势和光合特性研究[J]. 玉米科学,2008,16(4):100-104.
- [3] 郭庆法. 中国玉米栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004.
- [4] 陈国平. 玉米的干物质生产与分配(综述)[J]. 玉米科学,1994,2(1):48-53.
- [5] 王庆成. 中国玉米栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001.
- [6] DEMMIG A B, ADAMS W, BARKER D H, et al. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98(2):253-264.
- [7] ANDERSON J M, EVANS P K, GOODCHILD D J. Immunological cross-reactivity between the light-harvesting chlorophylla/b-proteins of a marine green alga and spinach[J]. Physiologia-Plantarum, 1987, 70(4):597-602.
- [8] GENY B. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence[J]. Biochimica-et-Biophysica-Acta, General-Subjects, 1989, 990(1):87-92.
- [9] SEATON C G, WALKER D A. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation[J]. Proc R Soc Lond B, 1990, 242:29-35.
- [10] 杨兴洪,赵世杰,邹琦. 遮阴和全光下生长的棉花光合作用和叶绿素荧光特征[J]. 植物生理学报,2005,29(1):8-15.

究,为解磷微生物的进一步研究及应用于农业奠定基础。

### 参考文献

- [1] 万璐,康丽华,廖宝文,等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J]. 林业科学研究,2004,17(1):89-94.
- [2] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料,2001,5(3):7-11.
- [3] 尹瑞玲. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. 土壤,1988,20(5):2243-2246.
- [4] 梁绍芬,姜瑞波. 解磷微生物肥料的作用和应用[J]. 土壤肥料,1994(2):46-48.
- [5] 闫志勇,王斌,苏维奇,等. 多重半套式 PCR 检测细菌 16 S rRNA 基因方法的建立[J]. 青岛大学医学院学报,2001,37(1):22-24.
- [6] 闫志勇,王斌,毕春霞. 多重半套式聚合酶链反应在检测脑脊液病原菌中的应用[J]. 中华流行病学杂志,2003,24(4):296-299.
- [7] 陈廷伟. 微生物对不溶性无机磷化合物的分解能力及其接种效果[J]. 微生物,1995,2(5):210-215.
- [8] 陈华癸. 微生物学[M]. 北京:农业出版社,1962.
- [9] 唐勇,陆玲,杨启银,等. 解磷微生物及其应用的研究进展[J]. 天津农业科学,2001,7(2):1-5.